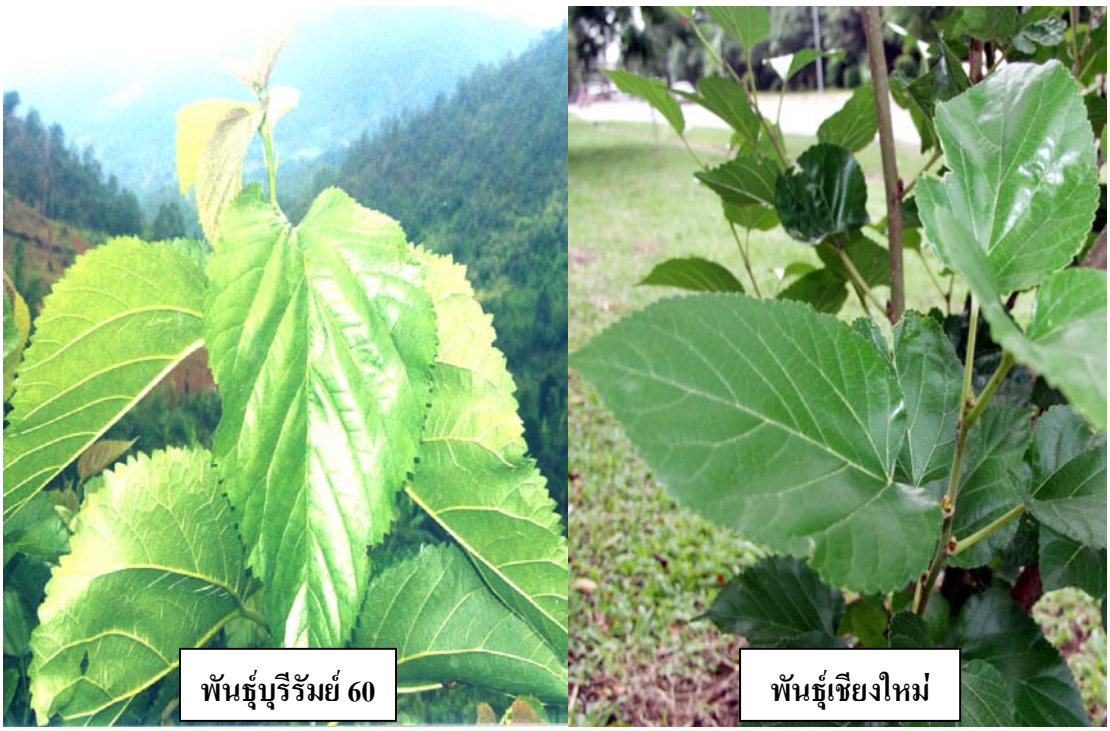
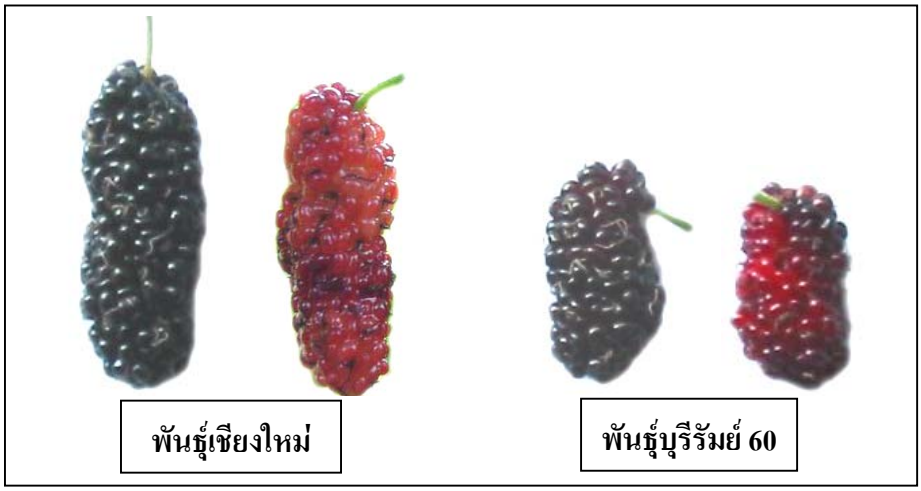
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
รูปภาพงานวิจัย

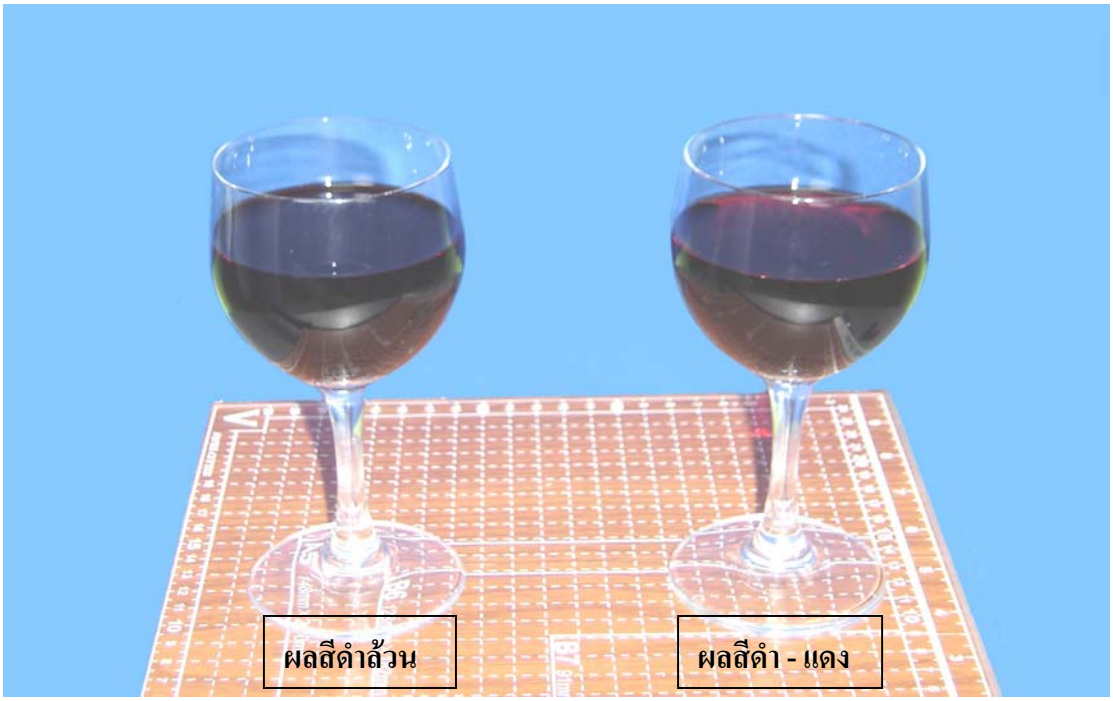


ภาพ ก.1 ใบของหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และสายพันธุ์เชียงใหม่

ภาพ ก. 2 การติดของผลหม่อนบนต้น



ภาพ ก. 3 ลักษณะของผลหม่อนสุกที่มีสีดำล้วน และสีดำ-แดงจากหม่อน 2 สายพันธุ์



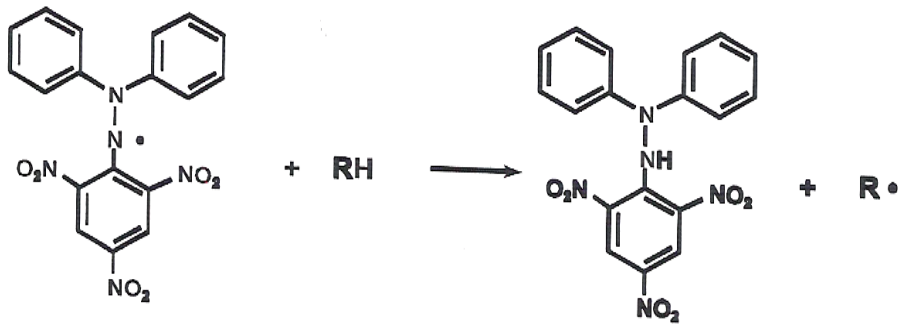
ภาพ ก. 4 ไวน์หม่อนที่ผลิตจากผลหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่มีระยะความสุกแตกต่างกัน

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์คุณภาพผลหม่อน

การวิเคราะห์คุณภาพผลหม่อน

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Spectrophotometric assay (สันติ และวรวรรณ, 2544)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระกระทำโดยอาศัยหลักการที่ว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical ทำให้สีม่วงของ DPPH จางลง ดังนั้นในการวิเคราะห์ จึงเตรียมสารละลายสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ แล้วทำปฏิกิริยากับสาร DPPH radical (ภาพ ข.1) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร หรือความยาวคลื่นที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุด นำค่าไปคำนวณหาร้อยละของสารต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenger) เพื่อสร้างกราฟ แล้วนำไปหาสมการจากเส้นแนวโน้ม จึงคำนวณค่าร้อยละ radical scavenger ที่ 50 หรือค่า IC_{50} (50 % inhibit concentration) เพื่อทราบความเข้มข้นของสารที่มีอยู่ โดยสารละลายที่มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูงแสดงว่ามีค่า IC_{50} อยู่น้อย

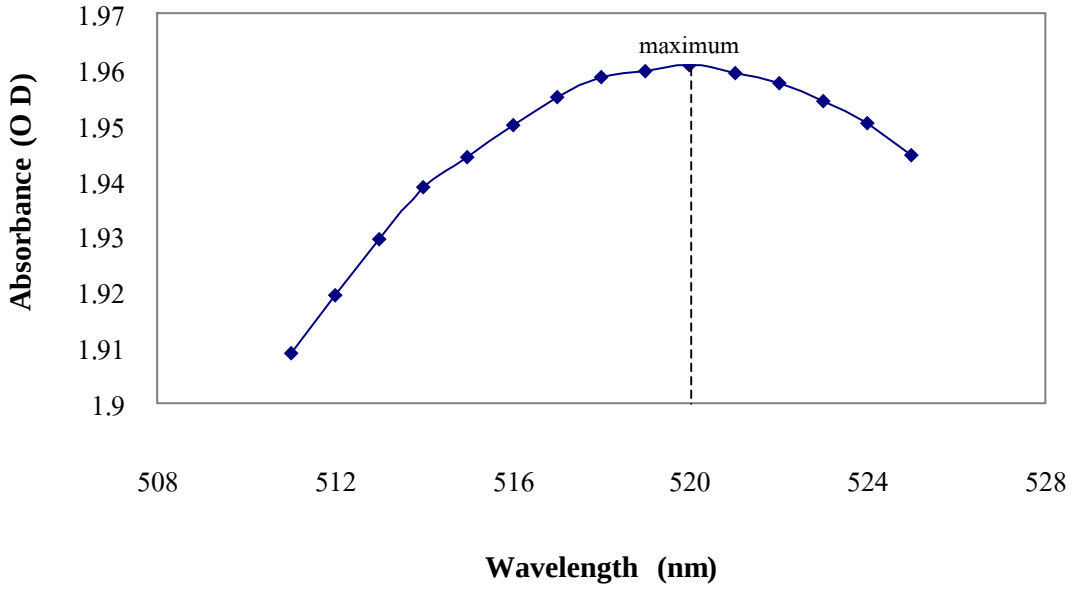


DPPH (สีม่วง) DPPH:H (ไม่มีสี)

ภาพ ข. 1 สูตรโครงสร้างของ 2,2 - diphenyl -1 - picrylhydrazyl (DPPH)

ที่มา : Prakash, 2001

ความยาวคลื่นแสงจากการใช้เครื่องSpectrophotometer ยี่ห้อ Perkin Elmer, รุ่น lambda 12 มีตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 518-528 นาโนเมตร ได้ออกมาดังนี้



ภาพ ข. 2 การดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 200 µM โดยวัดด้วยเครื่อง Spectrophometer

การเตรียมตัวอย่างหมอน

ชั่งผลหมอนสดมา 50 กรัม และสารละลายเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วนำไปปั่นด้วย blender นาน 2 นาที จากนั้นนำไปกรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปทำให้ได้ความเข้มข้นโดยเครื่อง evaporater ให้ได้สารละลายปริมาณ 2.5 กรัมต่อมิลลิลิตร (จากตัวอย่างที่ใช้สกัดจะได้ สารละลายอยู่ 20 มิลลิลิตร) แล้วเตรียม stock solution โดย ปิเปต สารละลายที่สกัดได้มา 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ให้ครบ 20 มิลลิลิตร แล้ว จะได้ความเข้มข้นเป็น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดมา 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ให้ครบ 10 มิลลิลิตร ก็จะได้ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างคือ 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเตรียมตัวอย่างไวน์หม่อน

ใช้ ปิเปตดูดตัวอย่างไวน์มา 1 มิลลิลิตร นำมาใส่ใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ก็จะได้ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง คือ 1:20 โดยปริมตร

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมไวน์ตัวอย่าง 1 ส่วนต่อสารละลาย DPPH 2 ส่วน ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ (โดยชั่งสารมา 19.7 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย เมทานอลร้อยละ 80 ให้ครบปริมาตร 250 มิลลิลิตร)

2 ส่วนแล้วนำมาผสมให้เข้ากัน (ต้องทำอย่างรวดเร็ว)

3. นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

5. คำนวณหาปริมาณร้อยละสารต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenger)

$$\% \text{ radical scavenger} = (1 - A_{sample} / A_{control}) \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายสกัดที่ผสมกับ DPPH

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละ radical scavenger $= 1 - (0.3782/1.3782) \times 100$

$= 72.6$

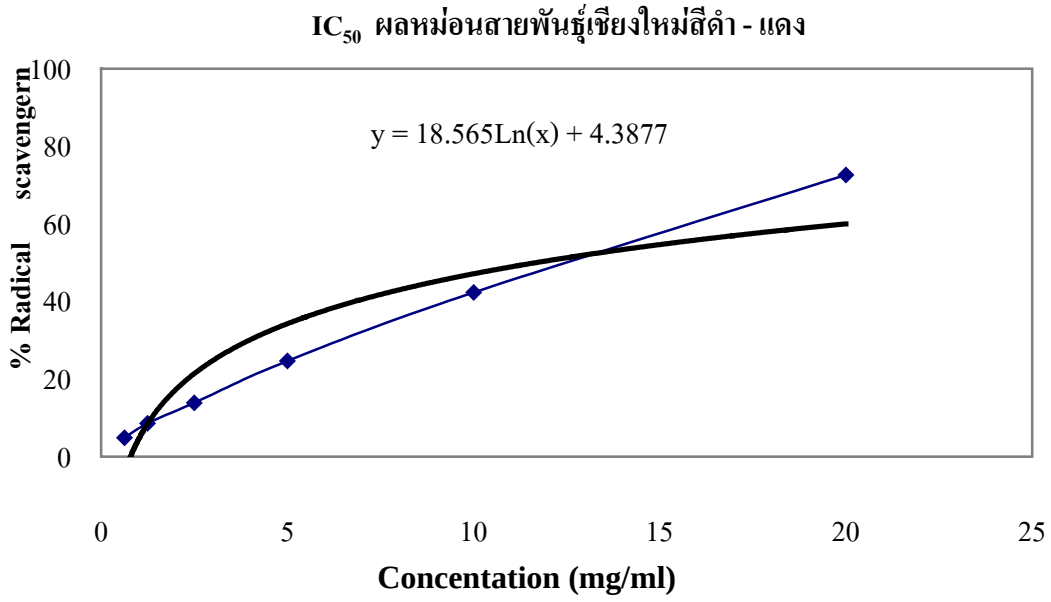
ตาราง ข. 1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดน้ำหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่ ผลสีดำ- แดง

conc. (มก./มล.)	**absorbance 520 นาโนเมตร**			**ร้อยละ radical scavenger**
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**เฉลี่ย**	
20	0.3794	0.377	0.3782	72.6
10	0.7959	0.794	0.795	42.3
5	1.0382	1.0372	1.0377	24.7
2.5	1.1876	1.1866	1.1871	13.9
1.25	1.2598	1.2594	1.2596	8.6
0.625	1.3104	1.3096	1.31	4.9
control	1.3794	1.3770	1.3782	0

การคำนวณหาค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 ได้โดยใช้วิธีการสร้างกราฟดังนี้

วิธีสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50}

1. เปิดโปรแกรม excel
2. แล้วให้นำค่าของความเข้มข้น และค่าการยับยั้ง หรือปริมาณร้อยละของสารต้านอนุมูลอิสระ เติมใน column
3. เมื่อเติมครบให้ลากเป็นกรอบดำกำกับตัวเลขทั้งหมด แล้วคลิกที่รูปกราฟแท่งทางด้านขวามือบน
4. จะปรากฏ chart wizard - step 1 of 4 ให้คลิกที่ XY (scatter) ดูกรอบทางขวา เลือกกราฟรูปที่ 2 คลิก next จะปรากฏ chart wizard - step 2 of 4 ให้คลิกที่ next
5. จะเข้าสู่ chart wizard - step 3 of 4 พิมพ์ chart title พิมพ์ value (X) axis และ value (Y) axis จากนั้นคลิกที่ next
6. จะเข้าสู่ chart wizard - step 4 of 4 พิมพ์ finish จะได้กราฟ
7. คลิกจุดบนเส้นกราฟจะพบจุดสีเหลือง คลิกขวาที่จุดเหลือง คลิกที่ Add Trendline
8. คลิกที่ logarithmic คลิกที่option คลิกเครื่องหมายถูกที่ display equation on chart
9. จะได้กราฟ พร้อมสมการดัง ตัวอย่างดัง ภาพ ข. 3 ซึ่งสามารถใช้ในการคำนวณหาค่า IC_{50} เช่นตัวอย่างจากผลหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่สีดำ- แดง



ภาพ ข. 3 กราฟการหาค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่ สีดำ-แดง

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องมือ Ebuliometer (Dujardin-salleron)

หลักการ

เป็นการบอกจุดเดือดของสารละลายผสมของน้ำและแอลกอฮอล์ เปรียบเทียบกับจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ โดยที่ปริมาณของแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น จะทำให้จุดเดือดลด ลงจากจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ ผลลัพธ์ที่ได้สามารถนำไปคำนวณเป็นร้อยละของแอลกอฮอล์ โดยปริมาตร แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่ปริมาณแอลกอฮอล์ ในตัวอย่างไวน์ต้องไม่สูงเกินกว่า ร้อยละ 16 โดยปริมาตร ดังนั้น ตัวอย่างไวน์ที่มีแอลกอฮอล์อยู่สูง ต้องทำการเจือจางก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 5 โดยปริมาตร และปริมาณน้ำตาลควรน้อยกว่าร้อยละ 2 โดยปริมาตร

การวิเคราะห์

1. การหาจุดเดือดของน้ำ

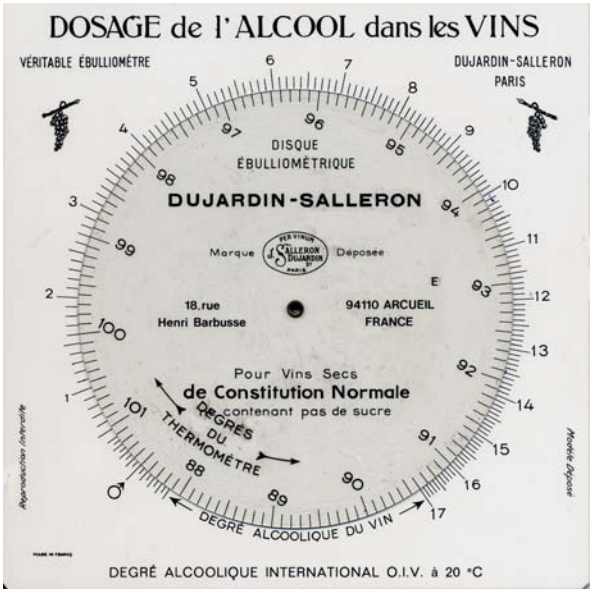
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตร ใส่ลงใน boiling chamber ต่อส่วน Reflux condenser จุดตะเกียง alcohol ในตำแหน่ง boiling chamber ต้มกระทั่งเดือด อ่านค่าอุณหภูมิของน้ำเดือดเมื่อปรอทขึ้นไปจนคงที่ ปรับตำแหน่งของสเกลให้อ่านค่าจุดเดือดของน้ำเป็นร้อยละ 0.0 โดยปริมาตรแล้วจึงหยุดการต้ม แล้วเทน้ำทิ้ง

2. การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

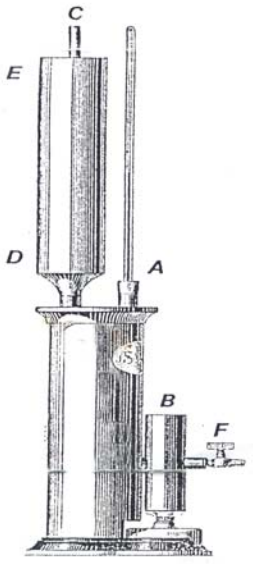
ใส่ตัวอย่างไวน์ลงไปเล็กน้อยเพื่อ rinse boiling chamber เทตัวอย่างทิ้งไป ตวงไวน์ลงไปให้ถึงขีดที่กำหนด ต่อส่วน condenser ลงไปในส่วน reflux condenser เติมน้ำเย็นลงไปในส่วน condenser จุดไฟให้ความร้อนจนไวน์เดือด ดูระดับปรอทที่ขึ้นไปและคงที่ อ่านค่าจุดเดือดของไวน์ตัวอย่าง

3. การทำความสะอาด

ควรทำความสะอาดเครื่องมือทุกครั้งที่เปลี่ยนตัวอย่างที่วิเคราะห์ ในส่วนของ boiling chamber ถ้ามีคราบของสารตัวอย่างติดอยู่ ให้ล้างทำความสะอาดด้วยร้อยละ 2 ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือเมื่อทำการวิเคราะห์ครบ 50 ตัวอย่าง หลังจากน้ำล้างด้วยด่างออกให้หมดด้วยน้ำเปล่า



ภาพ ข. 3 แผ่นอ่านปริมาณแอลกอฮอล์ (Dujardin-salleron)



ภาพ ข. 4 เครื่องวัดแอลกอฮอล์ Ebulliometer

การหาปริมาณ แอนโทไซยานินในผลหม่อนสด (Fuleki *et al*., 1968)

1. ชั่งน้ำหนักของนำผลหม่อนสดมา 5 กรัม ผสมกับสารละลาย เมทานอล : HCl เท่ากับ 99 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม และนำไปคนด้วยเครื่องกวนสารละลาย ประมาณ 2 ชั่วโมง และจึงนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอล (เมทานอล : HCl 99 : 1 (โดยปริมาตร) ให้ครบ 100 มิลลิลิตร (DF = 1 : 20)

2. ดูดสารละลาย (ข้อ 1) มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0

3. ดูดสารละลาย(ข้อ 1) มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5

4. นำสารละลายที่ปรับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 และ pH 4.5 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง และใช้สารละลายเมทานอล (เมทานอล : HCl 99 : 1 (โดยปริมาตร) เป็น blank sample

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณสารแอนโทไซยานิน จากสมการ

$$\textbf{\%}\ \text{w/w} = \ddot{A} \times \frac{MW}{EL} \times DF \times \frac{V}{Wt} \times 100$$

Absorbance (A) = $(A_{510}$ nm pH 1.0 – A_{700} nm pH 1.0) - (A_{510} nm pH 4.5 – A_{700} nm pH 4.5)

E = ค่าโมลาร์ Absorbance ของ Cyanindin – 3 – glucoside เท่ากับ 26900

MW = มวลโมเลกุล Cyanindin – 3 – glucoside เท่ากับ 445

L = ความกว้างของเซลล์ 1.0 เซนติเมตร

DF = เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ 50 มิลลิลิตร

V = ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 มิลลิลิตร

Wt = น้ำหนักของผลหม่อนตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีของ Rebelien Method (Iland *et al.*, 1993)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างนั้น สามารถหาได้หลายวิธี เช่น Lane and Eynon method, Rebelein method, Enzymatic analysis method หรือใช้เครื่อง HPLC สำหรับวิธี Rebelein method อาศัยหลักการของการที่น้ำตาลในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ alkaline cupric (Cu^{++}) ที่มากเกินพอ หลังจากนั้นทำการไตเตรทหาความเข้มข้นของ Cu^{++} ที่เหลือทำให้เราทราบ ปริมาณ Cu^{++} ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลได้

ปริมาณของ Cu^{++} ที่เหลืออยู่หลังจากทำปฏิกิริยากับน้ำตาลนั้นหาได้ โดยการรีดิวซ์ Cu^{++} ด้วย iodine และ หาปริมาณ iodine ด้วยการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulphate ดังสมการ

$$2Cu^{++}+2I^{-} \longrightarrow 2Cu^{+} + I_2$$

$$I_2+2S_2O_3^{=} \longrightarrow 2I+S_4O_6^{=}$$

ข้อดีของวิธี Rebelein method คือ

1. จุดยุติของการไตเตรทได้สีขาวครีม ซึ่งสังเกตุเห็นได้ง่าย
2. ไม่ต้องทำการไตเตรทขณะร้อน ทำให้สะดวกในการทำงาน
3. ปฏิกิริยาระหว่าง $2Cu^{++}+2I^{-}$ และ $I_2+2S_2O_3^{=}$ เป็นสัดส่วนโดยตรงกันทางเคมี ปัญหาของการ ไตเตรท คือสารฟีนอลิค จะรบกวนปฏิกิริยา จึงกำจัดสารสีออกจากตัวอย่างก่อน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ปีเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
5. hot plate
6. boiling chip
7. ลูกยาง
8. activated charcoal

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย Z 1 ตวงน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันจากนั้นชั่ง copper (cuptic) sulphate 41.92 กรัม ผสมลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท

2. สารละลาย Z 2 ชั่งน้ำหนัก sodium potassium tartrate 250 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร และชั่ง sodium hydroxide 60 กรัม ผสมลงไปช้าๆ เพราะจะเกิดความร้อนขึ้นในสารละลาย บางครั้งอาจจำเป็นต้องหล่อในน้ำเย็น เมื่อผสมเย็นลงแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท

3. สารละลาย Z 3 เตรียมสารละลาย sodium hydroxide 1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร (40 กรัมต่อลิตร) ใส่ลงในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และชั่ง potassium iodide 300 กรัม ละลายในสารละลายเบื้องต้น และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท

4. สารละลาย Z 4 ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น ร้อยละ 98 จำนวน 175 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น 825 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บางครั้งอาจจำเป็นต้องหล่อในน้ำเย็น เก็บไว้ในขวดแก้วสีชาปิดสนิท

5. สารละลาย Z 5 นำสารละลาย sodium hydroxide 1 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำสารนี้ไปละลาย กับ potassium iodide 20 กรัม และ soluble starch 10 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวยแก้วสีชาปิดสนิท

6. สารละลาย Z 6 ชั่ง sodium thiosulphate 13.78 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและเติมสารละลาย sodiumhydroxide 1 โมลาร์ จำนวน 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

การเตรียมตัวอย่าง

กรณีตัวอย่างเป็นน้ำผลไม้ ถ้าน้ำผลไม้มีสีเข้มจะต้องทำการ decolourised น้ำผลไม้ก่อน โดยใส่ activate charcoal 0.5 กรัม ลงในน้ำผลไม้ 100 มิลลิลิตร แล้วต้มน้ำเป็นเวลานาน 30 วินาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

กรณีตัวอย่างเป็นไวน์ ต้องกำจัดแอลกอฮอล์ออกจากตัวอย่างไวน์ โดยนำตัวอย่างไวน์ 100 มิลลิลิตร เติมเม็ด boiling chips ลงไป 2-3 เม็ด แล้วต้มให้เหลือปริมาณ 50 มิลลิลิตร ถ้าเป็นไวน์แดงต้องทำการ decolourised ซึ่งทำได้โดยการใส่ activate charcoal ลงไปประมาณ 0.5 กรัม แล้วต้มเป็นเวลานาน 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองหลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การวิเคราะห์ Blank และตัวอย่าง

1. ปิเปต Z 1 10 มิลลิลิตร และ Z 2 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ใส่ boiling chips ลงไป 2-3 เม็ด
3. ปิเปตน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์
4. ให้ความร้อนจนกระทั่งสารละลายเดือดเป็นเวลานาน 30 วินาที และทำให้สารละลายเย็นลง
5. เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องให้เติม Z 3, Z 4, และ Z 5 อย่างละ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ
6. ทำการไตเตรทสารละลายที่ได้นี้ด้วย Z 6 ในขณะที่ทำการไตเตรทจะต้องทำการเขย่าฟลาสก์ไปด้วย จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีครีม (จุดยุติ)
7. บันทึกปริมาณ Z 6 ที่ใช้ (blank titre) ซึ่งควรจะอยู่ในช่วง 29-31 มิลลิลิตร
8. ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ทำเหมือนในข้อ 1-7 แต่ใช้ตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร แทนน้ำกลั่นที่ใช้และบันทึกปริมาณ Z 6 ที่ใช้ (sample titre)

วิธีการคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร) = (Dilution factor) x (Blank titre - Sample titre)

ข้อแนะนำ

1. ตัวอย่างที่มีน้ำตาลมากกว่า 20 (กรัมต่อลิตร) จำเป็นต้องมีการเจือจางก่อน เพราะถ้าปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างมีค่ามากกว่า 30 (กรัมต่อลิตร) จะทำปฏิกิริยากับ Z 1 จนหมด ไม่มีเหลือให้ทำปฏิกิริยากับ Z 6 จึงไม่เห็นจุดยุติได้ และการกบันทึกค่า Z 6 ที่ใช้ จำเป็นจะต้องบันทึกค่าอย่างละเอียด
2. อาจเกิดปัญหาขึ้นในขณะสังเกตจุดยุติ ถ้ามีสารสีแดงในตัวอย่าง ดังนั้นจึงควรกำจัดสี ก่อนการวิเคราะห์

การหาปริมาณ SO_2 โดยวิธี Aspiration (Iland *et al*., 1993)

ปริมาณ SO_2 ที่พบอยู่ในน้ำหมัก น้ำผลไม้ หรือไวน์จะอยู่ในรูปเกลือโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ซึ่งเมื่อเติมลงไปจะแตกตัวอยู่ในรูปของ free SO_2 และ bound SO_2

ในการวิเคราะห์หา free SO_2 และ bound SO_2 โดยวิธี aspiration นี้จะได้ SO_2 ในรูปของ total SO_2 ซึ่ง free SO_2 จะเคลื่อนออกจากน้ำผลไม้หรือไวน์ โดยการกลายเป็นไอน้ำสู่อากาศและเคลื่อนเข้าสู่ตัวอย่างในสภาวะกรดในขวดกลม ส่วนก๊าซ SO_2 ที่เหลือจะผ่านไปยังสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นกลางซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกรดซัลฟูริค และนำกรดมาไตเตรท กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

สำหรับในสภาวะที่เป็นกรดแก่ และมีการให้ความร้อน bound SO_2 จะระเหยออกจากสารละลาย และถูกดักด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นกลาง แล้วเปลี่ยนเป็นกรดซัลฟูริคจึงนำมาไตเตรทเช่นเดียวกับ free SO_2

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการหา free SO_2

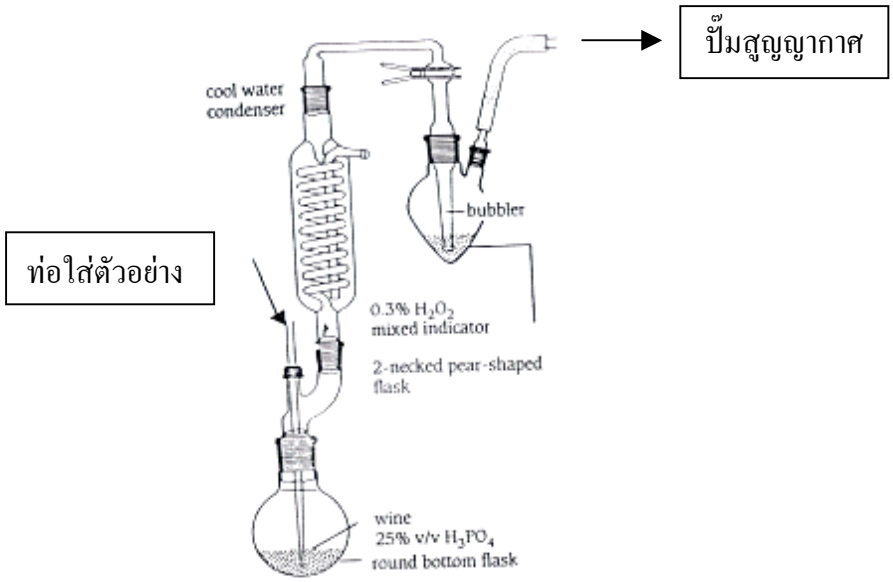
1. เตรียมอุปกรณ์ (ภาพ ข.5) ตรวจสอบอัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจนประมาณ 1 ลิตรต่อนาที
2. เติม 0.01 โมลาร์ NaOH ในไมโครบิวเรต
3. นำหลอดแก้วมาเติม 10 มิลลิลิตรของ H_2O_2 จำนวน ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร และหยดสารละลาย mix indicator 4 หยด แล้วเติม NaOH ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จนเปลี่ยนเป็นสีเขียว 30 วินาที
4. นำขวดแก้ว 2 คอ ต่อกับเครื่องแก้ว condenser เติม 10 มิลลิลิตร ของ H_3PO_4 ร้อยละ 25 โดยปริมาตร
5. ปิเปตไวน์ 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว 2 คอ
6. นำท่อก๊าซไนโตรเจนเข้าไปในขวดแก้ว 2 คอ ให้สัมผัสกับสารละลาย และตัวอย่างไวน์ใช้เวลา 15 นาที
7. หลังจากนั้น ปิดปั๊มก๊าซ และนำหลอดแก้วที่เก็บในก๊าซ SO_2 เปลี่ยนจากสารละลายสีเขียวเป็นสีม่วง ไปไตเตรทกับสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์
8. บันทึกผลจากการไตเตรท ซึ่งเรียกผลการไตเตรท คือ titre value A ขั้นตอนการหา bound SO_2
9. (ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์ และสารเคมี เหมือนกับการหา free SO_2)
10. เพิ่มการให้ความร้อนกับชุดเครื่องแก้วที่ใส่ 10 มิลลิลิตร ของ H_3PO_4 ร้อยละ โดยปริมาตร และไวน์ 20 มิลลิลิตร ใช้เวลาต้ม 15 นาที
11. ทำการทดลองเหมือนดังเช่น ข้อ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร
12. บันทึกผลจากการไตเตรท ซึ่งเราจะเรียกผลการไตเตรทนี้ว่า titre value B

วิธีการคำนวณ

free SO_2 (มิลลิกรัมต่อลิตร) = titre value A (มิลลิลิตร) x 16

bound SO_2 (มิลลิกรัมต่อลิตร) = titre value B (มิลลิลิตร) x 16

total SO_2 (มิลลิกรัมต่อลิตร) = free SO_2 + bound SO_2



ภาพ ข. 5 ชุดกลั่นหาซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ที่มา: Iland *et al*. (1993)

ภาคผนวก ค
แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสสำหรับไวน์หม่อน

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสสำหรับไวน์หม่อน

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบชิมตัวอย่าง จากซ้ายไปขาว โดยให้คะแนนตามคุณภาพของไวน์ เมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง ให้ดื่มน้ำล้างปากก่อนชิมตัวอย่างต่อไป

ชื่อผู้ทดสอบ……วัน เดือน ปี……

ชอบมาก	5	คะแนน	เฉย ๆ	2	คะแนน
ชอบ	4	คะแนน	ไม่ชอบ	1	คะแนน
ชอบปานกลาง	3	คะแนน	ไม่ชอบมาก	0	คะแนน

คุณภาพ (x น้ำหนัก)		ตัวอย่างไวน์			
ความใส (turbid, clear, brilliant)	(x2)				
สี (lighter, normal, darker)	(x1)				
ความซับซ้อนของกลิ่น (variety aroma & Bouquet)	(x6)				
รสชาติ (flavor)	(x3)				
ความเปรี้ยว (lower, right, over)	(x2)				
ข้อบกพร่อง (acetic, oxidized, moldy, sulfury, sulfide, bad after-taste, bitter)	(x2)				
คุณภาพทั่วไป (body, astringency, balance, after-tase)	(x4)				
คะแนนรวม (100 คะแนน)					

ที่มา : Yair (1996)

จากคะแนนของแต่ละ parameter 0-5 เมื่อ คูณด้วยน้ำหนักในแต่ละคุณภาพ ผลรวมทั้งหมดของแต่ละตัวอย่างเป็น 100 คะแนน

ข้อเสนอแนะ.....……

การให้คะแนน

100 – 96	ดีเยี่ยม	70 – 56	มาตรฐาน
95 – 86	ดีมาก	55 – 41	ต่ำมาตรฐาน
85 – 71	ดี	40 – 0	ไม่ยอมรับ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายสุรินทร์ บุญทราย
วันเดือนปีเกิด	1 พฤศจิกายน 2515
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ปีการศึกษา 2539
ประสบการณ์	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย